

## LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA HIDATIDOSIS EMPLEANDO CÉLULAS TRATADAS CON GLUTARALDEHIDO

J. F. WILLIAMS y U. PREZIOSO

### RESUMEN

Se evaluó el uso de glutaraldehído como agente de fijación y acoplamiento en la prueba de hemaglutinación pasiva para hidatidosis humana. Se determinaron las condiciones óptimas para la sensibilización de glóbulos rojos. Entre las condiciones de almacenamiento de células, la congelación rápida y mantenimiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  demostró ser la más satisfactoria. Esta técnica además de ser simple y rápida, da resultados altamente reproducibles y puede ser recomendada para aplicación en otros sistemas de parásitos-huéspedes.

### INTRODUCCIÓN

La prueba de hemaglutinación indirecta es uno de los métodos más sensibles y específicos para la diagnosis de la hidatidosis humana (KAGAN, 1968). Para subsanar los inconvenientes de la técnica, sería sumamente ventajoso contar con una suspensión estable de células sensibilizadas. Varios Autores han trabajado con células tratadas con formalina (ALLAIN & KAGAN<sup>1</sup>). Sin embargo, hemos encontrado ciertas dificultades para obtener resultados reproducibles con ese material, por lo cual examinamos la posibilidad de usar glutaraldehído. Este agente ha sido utilizado recientemente, con resultados altamente satisfactorios, en la fijación (BING & col.<sup>3</sup>) y sensibilización de eritrocitos (AVRAMEAS & col.<sup>2</sup>), y su empleo para antígenos de *Echinococcus* nos parece muy conveniente y confiable. A continuación se describen la técnica seguida y los resultados obtenidos.

### MATERIALES Y METODOS

Se recogió sangre de ovinos en solución estéril de Alsever y las células se mantuvieron generalmente durante 3-4 días a  $4^{\circ}\text{C}$

antes de ser lavadas tres veces en salina tamponada con fosfato 0.15M, pH 7,2 (PBS) y sensibilizadas con antígeno. La solución tamponada (PBS) fue preparada mezclando 40.0 g de NaCl, 7.4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}$  anhidro y 2.15 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro en 5 litros de agua destilada.

El líquido hidatídico para el antígeno fue extraído de quistes fértiles de *Echinococcus granulosus* provenientes de vísceras ovinas. Los escólices se eliminaron por sedimentación y el líquido se dializó contra PBS y se centrifugó a 1600 g durante 30 minutos. Para la concentración se empleó Carbowax (Union Carbide Co., Estados Unidos) o un ultrafiltro DIAFLO (Amicon Scientific Systems Division, Mass., Estados Unidos). Las concentraciones de proteína fueron determinadas por el método de LOWRY & col.<sup>7</sup>.

El procedimiento empleado para la sensibilización se basó en el descrito por AVRAMEAS & col.<sup>2</sup>. Se preparó una suspensión de eritrocitos ovinos en 10 ml de solución del antígeno, agregándose la cantidad óptima de glutaraldehído (solución acuosa 2,5%) con agitación suave. Después de 2 horas a temperatura ambiente, las células fueron lavadas tres veces en PBS y suspendidas en

una solución al 1% de suero normal de conejo a una concentración de 300.000/mm<sup>3</sup>. Las titulaciones se realizaron con un microtitulador (Cooke Engineering Company, Virginia, Estados Unidos). Como controles se usaron células sensibilizadas y suero humano normal, células sensibilizadas y diluyente solo, y células no sensibilizadas tratadas con glutaraldehído tanto con sueros normales como positivos. Para verificar los resultados se empleó una serie de sueros conocidos como positivos para hidatidosis. Las placas fueron agitadas y se leyeron los títulos dos horas más tarde.

Con el propósito de determinar las condiciones óptimas para el antígeno de prueba, se utilizaron diferentes concentraciones de eritrocitos y glutaraldehído, midiéndose la influencia de estas variaciones en base a los títulos de los sueros positivos. La gama de concentraciones de antígeno probadas abarcó de 0.2 mg de proteína/ml a 2 mg de proteína/ml. Se agregó glutaraldehído a la mezcla en cantidades comprendidas entre 0,5 y 4 ml, y se emplearon suspensiones de eritrocitos que variaban desde 4% hasta 10%.

La especificidad de células sensibilizadas fue probada usando sueros de individuos sanos y pacientes con diferentes enfermedades infecciosas (enfermedad de Chagas, infección por *Taenia saginata*, triquinosis).

Las células sensibilizadas se almacenaron en una suspensión al 1% a 4°C, liofilizadas o congeladas a -70°C, examinándose la reproducibilidad de los títulos con distintos lotes y después de diferentes períodos de tiempo.

#### RESULTADOS

Los patrones de hemaglutinación producidos por las células tratadas con glutaraldehído fueron claros y fácilmente legibles a las 2 horas. Los controles resultaron siempre negativos. La concentración óptima del antígeno para la sensibilización de 1 ml de glóbulos rojos concentrados fue de 1,0 mg/ml en un volumen total de 10 ml. Bajo estas condiciones fue necesario emplear 4 ml de glutaraldehído al 2,5%.

Al aumentarse la concentración del antígeno por encima de 1 mg/ml, los títulos no se elevaron. Las soluciones de antígeno utilizadas para sensibilizar las células perdieron su eficacia al agregar más eritrocitos no sensibilizados. Con cantidades de glutaraldehído inferiores a 4 ml, se obtuvieron títulos más bajos y fijación no satisfactoria de los glóbulos rojos, aún cuando el tratamiento se extendió a 3 horas, a menos que la cantidad de suspensión celular fuera proporcionalmente disminuída.

Las células conservadas a 4°C pudieron emplearse satisfactoriamente hasta 14 días después de la sensibilización; en adelante, los títulos comenzaron a bajar. Con la liofilización no se obtuvieron tan buenos resultados ya que aunque los títulos fueron detectables normalmente, los controles evidenciaron considerable aglutinación, y las células aglutinadas no pudieron eliminarse mediante la previa filtración a través de gasa quirúrgica.

La congelación resultó ser el mejor método para la conservación de las células, pero las suspensiones celulares debieron ser congeladas rápidamente en un baño de alcohol/hielo seco a -70°C. La congelación lenta, colocando las células en un refrigerador a baja temperatura (-70°C), siempre provocó aglutinación inespecífica. Por otra parte, con células congeladas rápidamente, se han obtenido resultados altamente reproducibles, con controles negativos, después de varias semanas a -70°C.

En una serie de pruebas sobre muestras de suero para el diagnóstico de hidatidosis se observaron títulos de hasta 1:1.048.566. En sueros de personas con otras enfermedades se obtuvieron reacciones no específicas de hasta 1:64. Títulos más altos que estos se consideraron significantes.

#### DISCUSION

BING & col.<sup>3</sup> fueron los primeros en usar glutaraldehído para la prueba de hemaglutinación, pero su interés era primariamente la fijación de los eritrocitos. AVRAMEAS & col.<sup>2</sup> notificaron que ese agente podía también ser empleado como reactivo de acoplamiento, obteniéndose títulos altos, reprodu-

cibles aún después de un almacenamiento prolongado. Observaron estos Autores que generalmente se necesitaban 1-2 mg de proteína para la sensibilización óptima de las células con el antígeno.

KRUPP<sup>6</sup> utilizó células tratadas con glutaraldehído en pruebas de hemaglutinación para amebiasis aunque los eritrocitos fijados fueron sensibilizados con ácido tánico en la forma convencional. La ventaja del método que describimos reside en la simplificación de la prueba mediante el uso adicional de glutaraldehído como agente de acoplamiento. Aún si no fuera posible el almacenamiento de las suspensiones sensibilizadas la sencillez del procedimiento y su reproducibilidad serían argumentos suficientes para recomendar su adopción. Sin embargo, la ventaja adicional de posibilitar la conservación de las células mediante su congelación sin que estas pierdan la actividad convierte al método en el procedimiento de elección para la diagnosis de la hidatidosis humana. Es de anticiparse la extensión del uso de este método en el campo de la inmunodiagnosis.

#### SUMMARY

*Indirect hemagglutination test with glutaraldehyde-treated cells for the diagnosis of hydatid disease*

The use of glutaraldehyde was evaluated as both a fixing and coupling agent in the passive hemagglutination test for human hydatid disease. Optimal conditions for the sensitization of red cells were determined and storage of rapid frozen cells at -70°C was found to be most successful. The tech-

nique is simple, rapid and gives highly reproducible results, and it can be recommended for application in other host-parasite systems.

#### REFERENCIAS

1. ALLAIN, D. S. & KAGAN, I. G. — The use of formalized red cells in the serology of hydatid disease. *J. Parasit.* 47:61-64, 1961.
2. AVRAMEAS, S.; TAUDOU BERNADETTE & CHUILON SYLVAIN — Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetra azotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive haemagglutination test. *Immunochemistry* 6: 67-76, 1969.
3. BING, D. H.; WEYAND, J. G. M. & STAVITSKY, A. B. — Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124: 1166-1179, 1967.
4. CHORDI, A.; GONZALEZ CASTRO, J.; TORMO, J. & DIAZ, R. — Hemaglutinación indirecta con células formoladas en el serodiagnóstico de la hidatidosis. *Rev. Med. E. G. Navarra* 6:27-39, 1962.
5. KAGAN, I. G. — A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39:25-37, 1968.
6. KRUPP, I. M. — Glutaraldehyde treated cells in the indirect hemagglutination test for amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 18:666-669, 1970.
7. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-276, 1951.

Recebido para publicação em 25/2/1971.